



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, C12N 15/10, C12P 19/34</b>		<b>A2</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/34981</b>
			(43) Date de publication internationale: 7 novembre 1996 (07.11.96)
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR96/00651</b>		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: <b>29 avril 1996 (29.04.96)</b>			
(30) Données relatives à la priorité: 95/05221      2 mai 1995 (02.05.95)      FR 95/09467      3 août 1995 (03.08.95)      FR		Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]; 1, rue Robert-et-Sonia-Delaunay, F-75011 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): NICOLAEVNA MERENKOVA, Irena [RU/FR]; 75, avenue Philippe-Auguste, F-75011 Paris (FR). DUMAS MILNE EDWARDS, Jean-Baptiste, Gabriel [FR/FR]; 8, rue Grégoire-de-Tours, F-75006 Paris (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, J., J. etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: METHOD FOR THE SPECIFIC COUPLING OF THE CAP OF THE EXTREMITY 5' OF A FRAGMENT mRNA AND PREPARATION OF mRNA AND COMPLETE cDNA

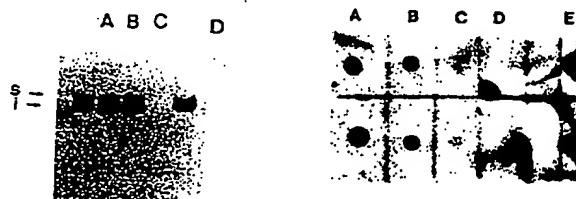
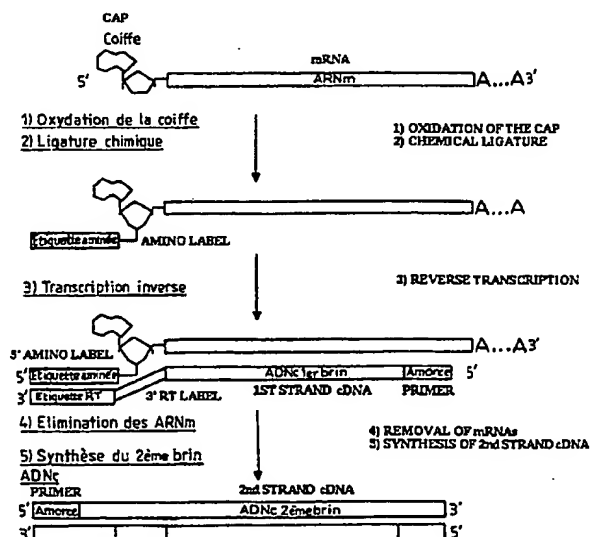
(54) Titre: METHODE DE COUPLAGE SPECIFIQUE DE LA COIFFE DE L'EXTREMITE 5' D'UN FRAGMENT D'ARNm ET PREPARATION D'ARNm ET D'ADNc COMPLET

## (57) Abstract

The present invention relates to a method for the specific coupling of the cap of the extremity 5' of a eucaryotic mRNA fragment by means of a molecule functionalized by an amine function. The present invention also relates to a method for isolating the extremity 5' of mRNA and a method for the preparation of the single strand cDNA extremity complementary of the extremity 5' of mRNA and of double strand cDNA corresponding to the extremity 5' of mRNA. The present invention also discloses a method for isolating full length cDNA corresponding to the totality of mRNA.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne une méthode de couplage spécifique de la coiffe de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARNm eucaryote par une molécule fonctionnalisée par une fonction amine. La présente invention fournit également une méthode d'isolement d'extrémité 5' d'ARNm et une méthode de préparation d'extrémité d'ADNc simple brin complémentaire de l'extrémité 5' d'ARNm et d'ADNc double brin correspondant à l'extrémité 5' d'ARNm. La présente invention fournit également une méthode d'isolement d'ADNc de pleine longueur correspondant à la totalité de l'ARNm.



# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

METHODE DE COUPLAGE SPECIFIQUE DE LA COIFFE DE L'EXTREMITÉ  
5' D'UN FRAGMENT D'ARNm ET PREPARATION D'ARNm ET D'ADNc  
COMPLET

5

La présente invention concerne une méthode de couplage spécifique de la coiffe de l'extrémité 5' des ARN messagers (ARNm) eucaryotes. La présente invention concerne également une méthode d'isolement d'ARNm d'eucaryotes comportant la coiffe à l'extrémité 5'. En outre la présente invention concerne une méthode de préparation d'ADNc simple brin (sb) complémentaire de l'extrémité 5' d'ARNm ou d'ADNc double brin (db) correspondant à l'extrémité 5' d'ARN ainsi que d'ADNc complet. La présente invention comporte en outre des troussees de réactifs pour la mise en oeuvre desdites méthodes. La présente invention concerne aussi une méthode de capture de protéine reconnaissant des ARN messagers. Enfin, la présente invention concerne également des fragments d'ARNm couplés spécifiquement par la coiffe 5' à une molécule.

20 L'activité des gènes est gouvernée par des domaines nucléiques situés en amont du site d'initiation de la transcription. Il est généralement admis que la région d'ADN génomique situé dans les 500 premiers nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription constituent le promoteur proximal. Celui-ci contient une grande partie des informations nécessaires à la régulation de la transcription. Certaines séquences facilitant ou inhibant la transcription des gènes se situent bien en amont (côté 5') ou en aval (côté 3') du promoteur proximal. La connaissance des séquences régulant l'activité des gènes est primordiale pour comprendre et à plus long terme modifier les mécanismes d'expression des gènes. La détermination de ces domaines régulateurs est grandement facilitée par l'isolement et la caractérisation des extrémités 5' des messagers. Celles-ci peuvent en effet être utilisées comme point d'ancrage dans le génome humain pour ensuite isoler les promoteurs à l'aide des techniques classiques de la biologie moléculaire ou encore permettre l'identification des gènes et le repérage des promoteurs par analyse informatique (séquences homologues) de séquences d'ADN génomique.

Bien que la séquence des extrémités 5' des ARNm soit d'une grande importance, les techniques classiquement utilisées pour caractériser et isoler des ARNm spécifiques passent par l'isolement des clones d'ADNc correspondants. Or par construction, ces clones sont plus ou moins tronqués dans les parties correspondant aux extrémités 5' des ARNm. Des améliorations certaines ont été récemment apportées dans l'isolement et la caractérisation des extrémités 5'. Frohman et Coll. (1) et Delort et Coll. (2) on décrit l'isolement des extrémités 3' des ADNc correspondant aux extrémités 5' des ARNm au moyen d'adjonction d'un homopolymère à leurs extrémités afin de faciliter le clonage de l'ADNc complet après amplification en chaîne par polymérase ("ACP = PCR" en anglais). Toutefois, les exemples d'application rapportés avec ces méthodes concernaient uniquement des ARN messagers relativement abondants. Delort et Coll. (2) ont montré que la méthode était difficilement applicable à des espèces moléculaires faiblement exprimées. L'inefficacité de la méthode est due à l'adjonction de séquences homopolymériques à l'extrémité 3' des ADNc grâce à l'activité de la terminale transférase. En effet, dans ce cas, l'amorce utilisée pour initier la synthèse du deuxième brin (dénommée amorce retour) puis éventuellement pour les ACP subséquentes contient nécessairement une queue homopolymérique à son extrémité 3'. Cette queue homopolymérique, de séquence anticomplémentaire de celle ajoutée à l'extrémité de 3' des ADNc, peut s'hybrider sur des séquences homopolymériques internes contribuant ainsi à la genèse de fragment d'ADN plus court que le fragment attendu. Un deuxième facteur limitant la sensibilité de la méthode est lié à l'amplification de fragments d'ADNc synthétisés par amorçage non spécifique. Ces fragments d'ADNc sont autant de cibles possibles pour l'amorce retour pourvu qu'ils présentent une séquence homopolymérique favorable à l'hybridation.

30

Pour pallier les inconvénients liés à l'adjonction de queue homopolymérique, Dumas Milne Edwards et Coll. (3) ont ligaturé à l'extrémité 3' des ADNc un oligonucléotide fonctionalisé (étiquette) grâce à l'activité de la ARN ligase du phage T<sub>4</sub>. La fonctionalisation de l'oligonucléotide visait à empêcher l'auto-ligature des étiquettes. Pour

35

cela, l'oligonucléotide devait présenter une extrémité 5' P et une extrémité 3' sans fonction hydroxyle. L'étiquetage des ADNc simple brin est supérieur à l'adjonction d'une queue homopolymérique, car une séquence définie est ajoutée à la molécule d'ADNc. Aussi, les difficultés liées à l'utilisation d'une amorce ayant une séquence homopolymérique à son extrémité 3' sont totalement éliminées. Ceci a considérablement amélioré l'isolement d'extrémité 3' d'ADNc. Les deux stratégies décrites précédemment présentent encore la limitation de partir d'ADNc c'est-à-dire, du produit de l'activité de la transcriptase. Or il est connu que l'enzyme peut avoir des difficultés à recopier les brins d'ARN messager, dans certaines régions riches en structures secondaires par exemple.

Pour contourner cette difficulté il a été proposé d'étiquetter directement les ARNm (4 - 7). Cette deuxième méthode repose sur l'ajout à l'extrémité 5' des ARNm d'une séquence totalement ou partiellement ribonucléotidique permettant à la fois de marquer l'extrémité 5' des ARNm et de fournir une séquence d'ancrage pour les manipulations de clonage. L'extrémité 5' des ARNm eucaryotes est protégée par une structure chimique particulière : la coiffe (méthyl-7-guanosine reliée à l'extrémité 5' des ARNs messagers par une liaison 5'-triphosphate). Dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de moyens biologiques permettant d'ajouter directement une séquence ribonucléotidique à la coiffe d'ARNm. Aussi, pour isoler les ARNs suivant cette méthode, il est nécessaire d'abord d'éliminer la coiffe des ARNm puis d'ajouter la séquence ribonucléotidique choisie. Cette méthode présente l'avantage de marquer spécifiquement les ARN à leur extrémité 5' à l'aide d'une séquence connue qui peut être utilisée comme cible d'amorces spécifiques utilisables pour synthétiser les deuxièmes brins ADNc et éventuellement pour réaliser des ACP. Toutefois, les manipulations réalisées sur les ARN, en particulier le nombre de réactions enzymatiques à réaliser limitent l'usage que l'on peut faire de cette méthode à des quantités importantes d'ARNm. Cette méthode a l'inconvénient de faire intervenir de nombreuses étapes enzymatiques qui peuvent être limitantes car les enzymes peuvent être contaminées par des ARNases, et entre chaque étape les manipulations permettant de purifier les acides nucléiques sont coûteuses en matériel.

Il a enfin été décrit un procédé de purification d'ARNm (8) dans lequel on utilise les propriétés d'une protéine particulière de reconnaître et se lier à la coiffe de l'extrémité 5' des ARNm après sélection des hétéroduplexes ADNc-ARNm. Cette méthode implique en effet la formation préalable d'hétéroduplexes ARNm-ADNc et ne peut donc s'appliquer qu'à des ARNm de configuration linéaire ou préalablement dénaturés. Toutefois, dans les conditions dénaturantes nécessaires à la linéarisation de la molécule d'ARN pour favoriser la fixation de la coiffe, ladite protéine décrite dans ce procédé se dénature également et perd ses propriétés de reconnaissance et d'affinité. Aucune des méthodes décrites à ce jour ne permet donc l'isolement des ARN messagers complets.

Un but de la présente invention est donc de fournir une méthode permettant d'isoler les ARN messagers complets et notamment leur extrémité 5', qui ne présente pas les inconvénients précités.

Un autre but de la présente invention est de fournir une méthode de préparation d'extrémité 3' d'ADNc simple brin complémentaire de l'extrémité 5' des ARNm et d'ADNc double brin correspondant à l'extrémité 5' des ARNm et notamment d'ADNc complet.

Pour ce faire, la présente invention fournit tout d'abord une méthode de couplage spécifique de la coiffe de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARN, notamment d'ARNm eucaryote par une molécule fonctionnalisée par une fonction amine qui comporte les étapes suivantes :

- a) on modifie spécifiquement l'extrémité 3' dudit fragment d'ARNm, de sorte que le dernier nucléotide ne comporte plus de groupe OH en positions 2' et 3' ;
- b) on réalise une oxydation spécifique de diol en dialdéhyde sur la fonction 2', 3'-cis diol de la méthyl guanosine de l'extrémité 5' desdits fragments d'ARNm ; et
- c) on réalise le couplage de la 2', 3' dialdéhyde obtenue à l'étape b) avec ladite fonction amine de ladite molécule biologique.

On entend ici par "molécule fonctionnalisée par une fonction amine", une molécule qui peut comporter naturellement une fonction aminé ou une molécule à laquelle on a adjoint une fonction amine. On entend par "fonction amine", le groupe amine tel quel ou une fonction  
5 comportant un groupe amine réactif tel que, hydrazide, carbazide, thiocarbazide ou semicarbazide.

L'extrémité 5' des ARN messagers est protégée par une structure particulière : la coiffe. La coiffe est formée d'une guanosine méthylée en  
10 position 7 et unie à l'extrémité 5' de la première base de l'ARN par une liaison 5'-5' tri-phosphate. Dans certains cas la guanosine est méthylée en positions 2 et 7. Enfin pour de rares messagers et pour de nombreux petits ARN nucléaires, la guanosine est triméthylée en positions 2, 7, 7 (9). Le sucre (ribose) de ce nucléoside particulier a une fonction 2', 3'-cis diol.  
15 Dans une molécule d'ARNm seules les deux extrémités (5' avec la coiffe et 3' avec le dernier sucre 2', 3'-OH) présentent ces diols. C'est pourquoi, selon la présente invention, pour diriger le couplage de la molécule biologique contenant une fonction amine spécifiquement vers l'extrémité 5' on modifie spécifiquement l'extrémité 3' desdites molécules d'ARN.  
20 Selon la présente invention il ne subsiste plus alors qu'un seul diol en 5' qui est oxydé en 2', 3' dialdéhyde dans des conditions d'oxydation spécifiques bien connues de l'homme de l'art (10, 11). Le dialdéhyde obtenu peut ensuite réagir avec de nombreux réactifs contenant notamment des molécules comportant une fonction amine. Le couplage de  
25 molécules photo-activables (10) et la biotinylation de protéines (12), d'oligonucléotides (11) ont déjà été décrits en faisant réagir un dialdéhyde avec de la biotine-hydrazine. La fixation de protéines à l'extrémité d'oligonucléotides synthétiques hydrazinés a été décrite (13). Cependant, la fixation ne se fait jamais sur la coiffe dans le cas d'acides nucléiques.

A l'étape a) on entend par "modification de l'extrémité 3'" la substitution, transformation ou élimination desdits groupes OH de la dernière base ou l'élimination ou l'adjonction à l'extrémité 3' dudit fragment d'ARNm d'un ou plusieurs nucléotides, de sorte que le dernier  
5 nucléotide de l'extrémité 3' ne comporte plus de groupe OH en position 2' et/ou 3' du cycle osidique.

L'objectif de l'étape a) est de supprimer la fonction 2', 3' diol de l'extrémité 3' de sorte que l'oxydation spécifique de fonction diol ne se  
10 produise pas à l'extrémité 3', mais seulement à l'extrémité 5'.

L'étape a) est facultative dans la mesure où certains fragments d'ARNm ne comportent pas de diol en position 2' et 3' de la dernière base de leur extrémité 3'.  
15

Dans un mode de réalisation, la modification de l'étape a) se fait par adjonction à l'extrémité 3' dudit fragment d'ARNm d'un nucléotide ou d'un oligonucléotide dont l'extrémité 3' ne comporte pas de fonction 2', 3' diol.

20 Le nucléotide ou l'oligonucléotide adjoint peut présenter à son extrémité 3', par exemple, au moins un groupe OH en 2' et 3' bloqué par un groupe protecteur.

25 La liaison entre l'extrémité 3' du fragment d'ARNm et le nucléotide ou l'oligonucléotide peut se faire par une liaison internucléotidique 5'-3' avec l'extrémité 5' du nucléotide ou oligonucléotide selon des méthodes connues de l'homme de l'art.

30 Dans un mode de réalisation particulier, on réalise une ligature d'un nucléoside diphosphate en 3' et 5' (pNp), notamment par l'adjonction de pCp, en utilisant une enzyme, notamment l'ARN ligase et plus particulièrement l'ARN ligase du phage T4 (14-15).



Lorsque le fragment d'ARNm comporte une extrémité 3' polyA se terminant en 3' par une fonction 2', 3' diol à l'étape a), la modification spécifique de l'extrémité-3' dudit fragment d'ARNm est réalisée par hydrolyse alcaline ménagée suivie d'une étape de séparation des  
5 fragments à extrémité 3' polyA générés par l'hydrolyse alcaline.

En effet, l'hydrolyse alcaline se fait spécifiquement à l'extrémité 3'. Elle génère plusieurs fragments dont un premier fragment comportant la coiffe en 5' et les autres ont une extrémité 5' OH, et leur extrémité 3' est du  
10 type 3'phosphate, 2'phosphate ou (2', 3') cyclophosphate, sauf un fragment comportant l'extrémité 3' du fragment d'ARNm initial qu'il faut donc éliminer.

Cette élimination peut se faire par tous moyens appropriés connus.  
15 Les fragments d'ARNm comportent le plus souvent une extrémité 3' constituée par un fragment polyA. Dans ce cas on peut éliminer ledit deuxième fragment, en particulier par fixation sur des oligonucléotides oligo dT, notamment à l'aide d'une colonne de chromatographie comportant une phase solide sur laquelle des oligo dT sont fixés.

20

L'hydrolyse alcaline ménagée se fait avantageusement en présence de NaOH 0.1M à 4°C pendant 40 à 60 minutes.

L'oxydation des diol du type  $\alpha$ -glycol par l'acide périodique ( $\text{HIO}_4$ )  
25 ou par le tétracétate de plomb provoque spécifiquement la coupure de liaison C-C entre les deux fonctions hydroxyl et la formation de dialdéhydes.

Dans un mode de réalisation particulier à l'étape b), ledit réactif  
30 d'oxydation spécifique des diols en dialdéhyde est du périodate, notamment de sodium.

Dans un mode de réalisation à l'étape c) les groupements dialdéhydes formés par oxydation réagissent principalement avec des

fonctions amines, dans des conditions de pH acide, notamment un pH variant entre 4 et 6. La liaison est ensuite stabilisée par réduction avec un borohydrure tel que  $\text{NaBH}_4$  et préférentiellement un cyanoborohydrure tel que  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , pour stabiliser la fonction hydrazone qui se trouve alors transformée en hydrazide.

De façon appropriée ladite molécule fonctionnalisée est une molécule biologique. Comme molécule biologique on peut citer en particulier les protéines telles que l'avidine ou des anticorps, les vitamines ou des molécules ligands entrant en jeu dans des interactions ligand/récepteur, ou encore des oligonucléotides.

La présente invention fournit également une méthode de marquage spécifique de la coiffe de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARNm eucaryote, caractérisée en ce qu'on utilise une méthode de couplage selon la présente invention, dans laquelle ladite molécule est une molécule de marquage.

On entend ici par "molécule de marquage" une molécule pouvant être détectée, directement ou indirectement c'est-à-dire après liaison par interaction ou couplage covalent avec une autre molécule et/ou une phase solide. Par "détection directe" on entend notamment les cas où ladite molécule comporte elle-même un élément détectable tel qu'un atome radioactif, ou ladite molécule est couplée à une enzyme que l'on peut détecter à l'aide d'un substrat chromogénique ou ladite molécule est couplée à une molécule fluorescente. Par "détection indirecte" on entend notamment les cas où ladite molécule est susceptible de réagir de manière physico-chimique ou par couplage covalent avec une autre molécule elle-même comportant un élément détectable directement tel qu'un atome radioactif, une enzyme ou une molécule fluorescente.

La présente invention a également pour objet une méthode d'isolement de l'extrémité 5' d'un ARNm eucaryote dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'on utilise une méthode de couplage selon la présente invention, dans laquelle ladite molécule est une molécule permettant l'isolement du fragment d'ARNm auquel elle est couplée.

On entend par "extrémité 5' d'un fragment d'ARNm" tout fragment qui comprend la coiffe méthyl-guanosine en 5'.

5 Par "molécule permettant l'isolement", on entend une molécule permettant l'isolement de façon directe ou indirecte du fragment d'ARNm auquel elle est couplée. Par "isolement direct" on peut citer le cas de la précipitation dans le cas d'une protéine. Par "isolement indirect" on peut citer le cas où ladite molécule est susceptible de réagir avec une phase solide ou une deuxième molécule fixée sur une phase solide.

10

La présente invention a également pour objet une trousse de réactifs utile pour la mise en oeuvre d'une méthode de couplage, de marquage ou d'isolement selon la présente invention, caractérisé en ce qu'elle comporte :

15

- des réactifs de modification à l'extrémité 3' desdits ARNm ;
- des réactifs d'oxydation de la fonction 2'3'-diol à l'extrémité 5' en dialdéhyde ; et
- des réactifs de couplage covalent entre la dialdéhyde et ladite fonction amine de ladite molécule.

20

En particulier, ledit réactif d'oxydation est du périodate de sodium.

25

Selon un mode de réalisation, lesdits réactifs de couplage avec ladite fonction amine comportent un tampon acide à pH entre 4 et 6 et un réactif de réduction consistant en un borohydrure.

30

Selon une variante avantageuse, lesdits réactifs de modification de ladite extrémité 3' sont des réactifs permettant le couplage de l'extrémité 3' dudit ARNm avec l'extrémité 5' d'un oligonucléotide ou d'un nucléotide ne comportant pas de fonction 2', 3' diol à son extrémité 3'.

35

En particulier, lesdits réactifs de modification de l'extrémité 3' dudit ARNm consistent en un nucléotide 3', 5' diphosphate pNp et en un enzyme de ligature ARN ligase notamment, l'ARN ligase T4.

La présente invention, permet aussi d'isoler l'extrémité 5' d'ARNm et notamment d'ARNm complets en tirant partie de la réactivité chimique de leur extrémité 5' et de la possibilité de la modifier chimiquement spécifiquement pour l'extrémité 5', de lui fixer une molécule, notamment  
5 molécule biologique telle que la biotine. Par la suite, les ARN ainsi marqués peuvent être sélectionnés par les techniques classiques permettant de les sélectionner, par exemple par l'utilisation de billes magnétiques couplées à de la streptavidine dans le cas d'ARN biotinylés. Dans ce cas, l'invention permet de purifier par capture sur bille d'avidine  
10 ou de streptavidine des messagers coiffés donc complets ou les extrémités 5' de messagers complets.

Plus précisément, la présente invention a donc en outre pour objet une méthode d'isolement d'ARNm complet notamment à l'extrémité 5',  
15 dans un échantillon biologique, caractérisée en ce que :

- 1) on réalise le marquage spécifique de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm avec une première molécule P1 selon la méthode de couplage de la présente invention pour obtenir le conjugué P1-ARNm ;  
20
- 2) on met ledit ARNm marqué par ladite première molécule biologique (P1-ARNm) en présence d'une deuxième molécule P2 qui interagit et se lie de façon covalente ou non covalente avec ladite première molécule de manière à former un conjugué ou  
25 respectivement un complexe (P2 / P1-ARNm) ;
- 3) on sépare ledit conjugué ou dit complexe P2 / P1-ARNm de l'échantillon et,
- 4) on effectue éventuellement la coupure de la liaison covalente ou la décomplexation pour récupérer l'ARNm marqué P1-ARNm.

30 De façon appropriée, à l'étape 2) ladite deuxième molécule se trouve fixée à une phase solide et, à l'étape 3) on sépare la phase solide revêtue dudit conjugué ou complexe de l'échantillon.

Toutefois, si lesdites molécules P1 et P2 sont des protéines, le complexe P2/P1 peut être récupéré par exemple par précipitation, dans ce cas l'usage d'une phase solide n'est pas nécessaire.

5 Dans un mode de réalisation, comme première (P1) et deuxième molécule (P2), on utilise des molécules biologiques qui interagissent entre elles par une liaison de type non covalent. De tels couples sont bien connus. On peut citer notamment les couples antigène/anticorps tel que digoxigénine (DIG) / anticorps anti-digoxigénine (anti DIG) ou des  
10 interactions entre molécules biologiques de type biotine/avidine ou streptavidine ou encore des réactions d'hybridation entre acides nucléiques complémentaires.

La fixation de P2 sur la phase solide peut être covalente ou non  
15 covalente selon des méthodes connues de l'homme de l'art.

Dans un mode de réalisation particulier, P1 est l'hydrazide de biotine et P2 est l'avidine ou la streptavidine. Dans ce cas, on peut séparer l'avidine ou la streptavidine du conjugué biotine-ARNm par simple  
20 chauffage, à environ 95°C dans du 2% SDS.

La phase solide peut être constituée par la face interne du récipient dans lequel se trouve l'échantillon biologique ou un élément tel que des billes que l'on introduit dans ledit récipient.

25

La méthode d'isolement d'ARNm selon l'invention peut comporter une étape supplémentaire de coupure entre P1 et ledit ARNm dans laquelle on sépare ladite première molécule biologique P1, pour récupérer l'ARNm non couplé.

30

La présente invention a également pour objet une trousse de réactifs d'isolement utile pour la mise en oeuvre d'une méthode d'isolement d'extrémité 5' d'ARNm selon l'invention, caractérisé en ce qu'elle comporte les éléments d'une trousse de réactifs de couplage

d'ARNm spécifique de la coiffe en 5' avec une dite première molécule biologique P1 selon la présente invention et une solution de ladite deuxième molécule ou une phase solide sur laquelle se trouve fixée de façon covalente ou non covalente une dite deuxième molécule biologique P2.

La présente invention a également pour objet une méthode de préparation d'extrémité 3' d'ADNc simple brin et notamment d'ADNc complet caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- 10 a) on effectue une transcription inverse d'extrémité 5' d'ARNm et notamment d'ARNm complet obtenu par une méthode d'isolement d'extrémité 5' d'ARNm selon la présente invention ;
- b) on élimine les ARN simples brins et fragments d'ARN non hybridés pour obtenir une population d'hétéroduplexes ADNc/ARNm dans lesquels l'ARNm est un ARNm complet dont la
- 15 coiffe en 5' est couplée spécifiquement par une dite première molécule.
- c) on capture lesdits hétéroduplexes à l'aide d'une phase solide revêtue de ladite deuxième molécule biologique et,
- 20 d) on effectue une déshybridation des hétéroduplexes pour récupérer les fragments d'ADNc simple brin comportant l'extrémité 3' et notamment les ADNc simple brin complets.

Avantageusement à l'étape b), l'élimination des ARN simples brins ou fragments d'ARN non hybridés s'effectue par traitement enzymatique à l'aide d'une enzyme qui dégrade les ARN simples brins ou non hybridés et conserve intacts les hétéroduplexes ARN/ADN.

En particulier, après synthèse d'un ADNc, l'élimination par la

30 RNase T1 ou des Nucléases S1 des molécules d'ARN ou des fragments d'ARN libres conduit à l'obtention d'une population d'hétéroduplexes contenant une molécule d'ARNm coiffé. Le couplage, notamment la biotinylation de la molécule d'ARN permet sa capture par les méthodes mentionnées ci-dessus et donc la purification de molécules d'extrémité 3' d'ADNc et

35 notamment d'ADNc complets.

La présente invention permet également de réaliser par voie chimique la ligature d'une "étiquette" à la coiffe des ARNs messagers eucaryotes en vue de la préparation d'ADNc double brin, ladite séquence étiquette servant de cibles d'amorces utilisées pour synthétiser les  
5 deuxièmes brins d'ADNc. On entend ici par "étiquette", une séquence d'acide nucléique déterminée (désoxyribo, ribonucléotidique ou assimilée) quel que soit le procédé ayant permis d'obtenir cette séquence. Ceci recouvre donc les séquences naturelles ou synthétiques quelle que soit la chimie utilisée pour les obtenir.

10

La méthode d'étiquetage selon l'invention permet de s'affranchir des difficultés liées à l'utilisation d'enzymes pour réaliser l'étiquetage des extrémités 5' des ARNm. Dans la voie enzymatique d'étiquetage des ARNm impliquant l'élimination préalable de la coiffe, la réaction de ligature est  
15 catalysée par une enzyme (la T4 ARN ligase) qui unit une extrémité 3'-OH à une extrémité 5'-P. De ce fait, avant le "décoiffage" des ARNm, il faut inactiver les extrémités 5'-P des ARNs non coiffés, ce qui rajoute une étape enzymatique (catalysée par une phosphatase telle qu'une phosphatase alcaline de bactérie (BAP) ou phosphatase alcaline d'intestin de veau  
20 (CIP)). Comme la méthode utilisée se base sur la réactivité de la coiffe, dans une population complexe d'ARN, seuls les ARN messagers coiffés sont étiquetés.

La présente invention a donc également pour objet une méthode de  
25 préparation d'ADNc double brin eucaryote correspondant à l'extrémité 5' d'ARNm et notamment d'ADNc complet dans laquelle on effectue les étapes suivantes :

a) On effectue le couplage de la coiffe de l'extrémité 5' d'un  
30 fragment d'ARNm eucaryote, selon une méthode de la présente invention dans laquelle ladite molécule fonctionnalisée est un oligonucléotide étiquette comportant une fonction amine à son extrémité 3', et dans laquelle méthode, la première étape de modification de l'extrémité 3' de l'ARNm est facultative,

35

b) On effectue la transcription inverse de l'ARNm ligaturé obtenu à l'étape a),

c) On dénature les hétéroduplexes obtenus à l'étape b) et on élimine les ARN simples brins pour obtenir le premier d'ADNc, puis

5 d) On effectue la synthèse du deuxième à l'aide de l'ADN polymérase et d'une amorce dont la séquence est anti-complémentaire de la totalité ou d'une partie de la séquence de l'oligonucléotide étiquette.

On a en effet, découvert selon la présente invention, la possibilité d'effectuer une transcription inverse à travers la coiffe. Cette faculté  
10 n'avait jamais été démontrée avant la présente invention.

Cette méthode permet d'obtenir l'ADNc double brin comportant l'extrémité correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNm et notamment d'ADNc complet correspondant à l'ARN messager complet.  
15

La méthode de ligature chimique de l'étape a) utilise la réactivité des diols, dans une molécule d'ARN coiffée, les deux extrémités du fragment d'ARNm peuvent donc réagir. Une réaction au niveau de la seule coiffe est possible, il faut pour cela bloquer l'extrémité 3' des ARNs coiffés en éliminant la fonction 3'-OH. Toutefois, la ligature d'une étiquette à  
20 l'extrémité 3' des ARNm ne limite en rien l'utilisation de l'invention comme cela ressort du schéma de la figure 3. En effet, il s'agit dans ce cas d'une ligature 3'-3' et, de toute façon, les amorces utilisées pour amorcer la transcription inverse sont alors situées en amont de la séquence  
25 nucléotidique ajoutée. Pour un meilleur rendement, l'étape de modification de l'extrémité 3' de l'ARNm en vue d'une ligature spécifique de l'étiquette à l'extrémité 5' dudit ARN peut être préférée.

Au cours de l'étape a) du procédé de préparation d'ADNc double brin  
30 selon l'invention, on utilise préférentiellement pour la ligation un oligonucléotide étiquette synthétisé par voie chimique. La synthèse de cet oligonucléotide étiquette est réalisée en tenant compte du fait qu'il est essentiel d'utiliser un oligonucléotide non complémentaire du produit d'extension d'amorce, pour éviter l'amplification d'ADN allochtone.  
35



La longueur de l'oligonucléotide étiquette utilisé dans l'invention doit être suffisante pour permettre l'hybridation d'une amorce utilisable par l'ADN polymérase. Préférentiellement, on utilise un oligonucléotide d'une longueur au moins égale à 10 nucléotides. Pour une meilleure mise en oeuvre de l'invention, il peut être préférable d'utiliser un oligonucléotide étiquette ayant une longueur suffisante pour permettre la réalisation d'étapes supplémentaires d'amplification. Dans ces conditions, la longueur de l'oligonucléotide étiquette est avantageusement comprise entre 10 et 40 nucléotides. Dans un mode de réalisation la fonction amine de l'oligonucléotide étiquette est un groupe hydrazide à son extrémité 3'.

Un autre objet de l'invention réside dans une trousse pour la mise en oeuvre du procédé de préparation d'ADNc double brin décrit ci-avant, comprenant notamment l'oligonucléotide étiquette comportant éventuellement une fonction amine à son extrémité 3' et les réactifs permettant sa ligation à l'extrémité 5' de l'ARNm.

Selon une variante particulière de l'invention, la trousse comprend également les amorces et enzymes permettant la transcription inverse de la matrice initiale d'ARN en ADNc-sb et les amorces et enzymes permettant la synthèse du deuxième brin. Selon une autre variante particulière de l'invention, la trousse comprend également les amorces et enzymes permettant l'amplification de l'acide nucléique double brin cloné.

La présente invention a également pour objet une méthode de capture d'une protéine Po reconnaissant un ARNm dans laquelle on utilise de l'ARNm obtenu par une méthode d'isolement selon la présente invention, que l'on met en présence de ladite protéine, puis on récupère le complexe (Protéine/ARNm complet) et on effectue une décomplexation pour récupérer ladite protéine.

Ledit ARNm utilisé peut être couplé à ladite molécule P1 ou en être séparé. De même, ledit ARNm ou conjugué P1-ARNm peut être fixé à une phase solide. En particulier, le conjugué P1-ARNm peut être fixé à une phase solide par l'intermédiaire d'une interaction avec ladite molécule P2 elle-même fixée sur ladite phase solide.

Cette méthode de capture peut s'appliquer en particulier à au moins deux situations biologiquement intéressantes :

- isolement de protéines impliquées dans la régulation de la traduction et de la stabilité des ARN messagers ,
- 5       - si les ARNm sont des ARNpré-messagers, la préparation peut être utilisée pour capturer des protéines ou des complexes (SNURPS) intervenant dans l'épissage.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention  
10 apparaîtront à la lumière des exemples de réalisation détaillée qui vont suivre. Ces exemples sont illustrés par la figure 1 qui représente l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, d'oligonucléotides non coiffés (colonnes A et B) et coiffés (colonnes C et D) marqués par ligature de pCp radioactif  $^{32}\text{P}$  et qui ont été soumis au procédé biotinylation de la coiffe  
15 décrit dans l'exemple 1 (colonnes B et D) ou non soumis à ce procédé (colonnes A et C).

La figure 2 montre les résultats obtenus lors de la récupération des oligonucléotides biotinylés et capturés par des billes de streptavidine  
20 magnétique.

La figure 3 représente le schéma de la ligation chimique d'acides nucléiques à l'extrémité 5' des ARNm. Après purification des ARNm par chromatographie oligo-dT, les ARNs, dont l'extrémité 3'-OH a  
25 éventuellement été bloquée, sont oxydés en présence de périodate (étape 1). Puis, une étiquette nucléotidique hydrazinée est ligaturée aux ARNs oxydés (étape 2). La transcription inverse (étape 3) est amorcée (amorce) au moyen d'oligo-dT, d'hexameres à séquence aléatoire ou encore d'amorces ayant une séquence spécifique. Lorsque la transcriptase  
30 inverse traverse la coiffe, elle peut recopier l'étiquette (Etiquette RT). Après élimination des ARNs (étape 4), la synthèse des ADNc deuxième brin (étape 5) initié avec une amorce choisie pour s'hybrider avec la séquence de l'étiquette rétro-transcrite (Etiquette RT), conduit à l'obtention d'ADNc double brin contenant au moins l'extrémité 5' des ARNm.

La figure 4 représente une autoradiographie d'un électrophoregramme de gel de polyacrylamide 8% d'oligoribonucléotides de 200 nucléotides marqués au pCp coiffés (colonnes C et D) ou non (colonnes A et B) ligaturés (colonnes B et D) ou non (colonnes A et C) à une étiquette.

La figure 5 représente une autoradiographie d'un électrophoregramme de gel de polyacrylamide 12 % d'oligoribonucléotides de 46 nucléotides marqués au pCp coiffés (colonnes C, D et E) ou non (colonnes A et B) ligaturés (colonnes B, D et E) ou non (A et C) à une étiquette.

La figure 6 représente l'autoradiographie d'un électrophoregramme sur gel de polyacrylamide 12 % des ARNs étiquetés (C,D) ou non (A,B) avant (A,C) ou après (B,D) transcription inverse.

La figure 7 représente l'autoradiogramme d'un gel de polyacrilamide 8% d'oligoribonucléotide de 200nt radiomarqués en 3' par ligature avec du  $^{32}\text{pCp}$ . Colonne A : oligoribonucléotide de 200nt non coiffé, oxydé et ligaturé à l'étiquette hydrazinée. Colonnes B : oligoribonucléotide de 200nt coiffé, oxydé et ligaturé à l'étiquette hydrazinée.

La figure 8 représente une autoradiographie d'une membrane de nylon sur laquelle les ARN étiquetés et des témoins ont été déposés après hybridation d'une sonde radiomarquée (par kination : réaction de phosphorylation) correspondant à un oligodésoxyribonucléotide de séquence anticcomplémentaire à celle de l'étiquette. Tous les points sont dupliqués. Colonnes A à D : 0,5, 5, 25 et 50 fmôles d'étiquette. Colonne E : 1/10ème des ARNm étiquetés ont été déposés en deux dépôts.

La figure 9 montre une autoradiographie d'une membrane de nylon sur laquelle les ADNc simples et des témoins ont été déposés après hybridation avec une sonde oligodesoxyribonucléotidique radiomarquée par phosphorylation de son extrémité 5' dont la séquence est identique à celle de l'étiquette. Les colonnes A à E représentent différentes

concentrations (1 pmôle, 100 fmôles, 50 fmôles, 10 fmôles et 1fmôle) d'un oligodesoxyribonucléotide témoin de séquence identique à celle de l'étiquette ligaturée. Colonne F : dépôt des ADNc-simple brin étiquetés.

5            La figure 10 représente la photographie d'un gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium des produits d'ACP de la transcription inverse (1/20ème des produits de transcription inverse ont été utilisés pour chaque réaction d'ACP).

10           Colonne A et B : marqueurs de poids moléculaires (décrire).  
Colonnes C et D : ACP avec les amorces globines en présence d'ADNc (Colonne C) ou non (Colonne D). Colonne E et F : ACP avec les amorces deshydrogenase en présence d'ADNc (colonne E) ou non (colonne F).  
Colonnes G et H : ACP avec les amorces pp15 en présence (colonne G) ou  
15           non (colonne H) d'ADNc. Colonne I et J : ACP avec les amorces EIE4 en présence (colonne I) ou non (colonne J) d'ADNc.

20           Dans les colonnes C, E, G et I, la présence d'une bande à la taille attendue témoigne de la présence de la séquence correspondante dans la population d'ADNc.

25           La figure 11 représente la photographie d'un gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium. Mêmes légendes que la figure 10 mais, les ACP ont été réalisées avec les oligonucléotides anti-sens de chaque couple d'amorce et un oligonucléotide dont la séquence correspond à celle de l'étiquette ligaturée. Les produits d'amplification des colonnes C et E montrent que la transcription inverse a recopié la molécule d'ARN et l'étiquette oligodésoxyribonucléotidique ligaturée.

EXEMPLE 1 : Marquage spécifique de la coiffe 5' d'ARNm

1. Ligature du nucléoside biphosphate pCp à l'extrémité 3' d'ARN messenger.

5

1 µg ARN est incubé dans un milieu réactionnel final de 10 µl en présence de :

- a) 5u d'ARN ligase du phage T<sub>4</sub> dans le tampon fournit par le fabricant (Gibco - BRL) et,
- 10 b) 40u de l'inhibiteur des ARNase : RNazine commercialisé par la Société Proméga et,
- c) 2 µl de <sup>32</sup>pCp Amersham #PB 10208. L'incubation peut être réalisée à 37°C pendant 2 heures ou toute la nuit à 7-8°C.

15

2. Obtention de l'ARN sous sa forme coiffée et non coiffée.

L'ARN est obtenu par transcription in vitro à partir d'une matrice d'ADN double brin portant le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7.

20

2.1. Production de la matrice d'ADN double brin.

Les matrices d'ADN double brin sont obtenues par PCR de la façon suivante : un oligonucléotide de séquence 5' CT TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAT CCT ACT CCC ATC CAA TTC CAC CCT AAC TCC TCC CAT CTC CAC 3' (la séquence promotrice de l'ARN polymérase du phage T7 est en italique) est amplifié en utilisant un primer 5' de séquence 5' CT TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAT C 3' et un primer 3' de séquence 5' GTG GAG ATG GGA GGA GTT AGG GTG 3'. Chaque réaction est réalisée dans un volume de 100 µl et contient 2mM MgCl<sub>2</sub> ; 200 µM de chacun des dNTP ; 60 pmoles de chacun des primers;

25

30 1ng de matrice ADN simple brin et 2,5 unités de Taq ADN

polymérase. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 1 cycle comprenant 3 min. à 94°C, 30 sec. à 53°C et 30 sec. à 72°C ; 25 cycles comprenant 1 min. à 94°C, 30 sec. à 53°C et 30 sec. à 72°C ; 1 cycle avec 1 min. à 94°C, 30 sec. à 53°C et 5 min. à 72°C. Les produits d'amplification sont alors séparés par électrophorèse sur gel acrylamide 10 % non dénaturant puis visualisés par UV shadowing. Les matrices d'ADN double brin sont alors éluées du gel, soumises à une extraction phénolique puis récupérées par précipitation alcoolique.

## 10 2.2. Synthèse de l'ARN coiffé ou non coiffé.

L'ARN est obtenu par transcription in vitro de la matrice ADN double brin en utilisant le kit de transcription "AmpliScribe T7" (Epicentre Technologies). Lorsque le milieu réactionnel comporte les 4 NTP, l'ARN produit est dépourvu de coiffe (il est alors doté d'une extrémité 5' de type 5'pppGpNpN...). Pour obtenir l'ARN coiffé, le GTP est remplacé par un analogue de la coiffe, le m7G(5')ppp(5')G. Ce composé, reconnu par la polymérase, est incorporé à l'extrémité 5' du transcrit naissant lors de l'étape d'initiation de la transcription. Toutefois, il ne peut pas être incorporé lors de l'étape d'élongation. Aussi, l'ADN servant de matrice pour la synthèse de l'ARN a été conçu de telle sorte que le brin codant ne porte qu'une seule cytosine en position +1.

## 25 3. Oxydation de la coiffe en 5'

On dissout 0,1 OD d'ARN : on a utilisé deux oligoribonucléotides de 47 et 46 nucléotides dont 1 coiffé (+Cap, 47 nucléotides), et l'autre non coiffé (-Cap, 46 nucléotides).

+Cap : -m7 GpppGCAUCCUACUCCCAUCCAAUCCACCCUAACUCCUCCCAUCUCCAC

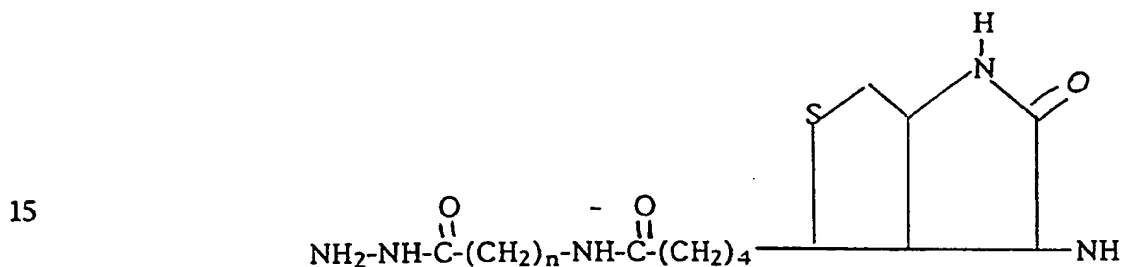
30 -Cap : pppGCAUCCUACUCCCAUCCAAUCCACCCUAACUCCUCCCAUCUCCAC

dans 9 µl de tampon acétate (0.1 M acétate de sodium pH 5.2) et 3 µl de solution de periodate de sodium 0.1 M préparée extemporanément.

On incube le mélange 1 heure à l'obscurité. Puis on arrête la réaction en ajoutant 4  $\mu$ l d'éthylène glycol 10 %. On effectue une précipitation éthanolique du produit et on dialyse contre de l'eau.

#### 5 4. Couplage du dialdéhyde avec de la biotine

On dissout le produit d'oxydation obtenu à l'étape précédente dans 50  $\mu$ l d'acétate de sodium à pH entre 5 et 5.2 et 50  $\mu$ l de solution d'hydrazide de biotine 0.02M préparée extemporanément dans un mélange  
10 méthoxyéthanol/eau (1:1) de formule :



On a utilisé un espaceur au sein de l'hydrazide de biotine ayant n=5. On peut très bien utiliser les autres hydrazides disponibles dans le  
20 commerce : avec n variant de 0 à 5.

Puis on incube 2 heures à 37°C. On précipite à l'éthanol et on dialyse contre de l'eau distillée.

#### 25 EXEMPLE 2 : Capture de l'ARNm marqué avec des billes magnétiques

1. Les billes magnétiques revêtues de Streptavidine sont préparées selon les instructions du fournisseur (CPG Inc. USA). Les ARN sont ajoutés dans un tampon d'hybridation (NaCl 1,5M, pH 5-6). Puis après 30 minutes  
30 d'incubation le matériel non fixé et non biotinylé est éliminé. Les billes sont lavées plusieurs fois à l'eau avec 1% de SDS.

## 2. Récupération de l'ARNm

On incube les billes obtenues 15 minutes à 95°C dans de l'eau contenant 2% de SDS.

5

## 3. Résultats expérimentaux

Dans les deux cas, figures 1 et 2, les résultats expérimentaux présentés correspondent à des autoradiogrammes de gel d'acrylamide 12 % de 0,4 mm d'épaisseur en tampon TBE.

10

La figure 1 montre les résultats obtenus avec des oligoribonucléotides de 47 nucléotides dont les séquences nucléotidiques correspondent aux séquences données ci-dessus (exemple 1) :

15

Colonnes A et B : oligonucléotide de 46 nucléotides sans coiffe marqué au pCp radioactif (exemple 1, 1.) soumis (B) ou non soumis (A) au procédé décrit en exemple 1, paragraphes 3. et 4. Colonnes C et D : oligonucléotide de 47 nucléotides avec coiffe marqué au pCp radioactif soumis (D) ou non soumis (C) au procédé décrit en exemple 1 (paragraphes 1. à 4.).

20

La différence de migration observée entre les colonnes A et C est due à la présence de la coiffe sur les oligonucléotides migrant dans la colonne C. La différence de migration observée entre les colonnes C et D est due à la biotynylation de la coiffe des oligonucléotides. Ceci démontre la spécificité de la biotynylation de la coiffe.

25

La Figure 2 montre les résultats obtenus lors de la récupération des oligonucléotides biotynilés et capturés par la streptavidine magnétique. L'oligonucléotide a été marqué au pCp radioactif en 3', puis soumis au procédé décrit dans l'exemple 1.1. Par la suite, les oligonucléotides biotynilés ont été capturés avec des billes magnétiques comme décrit dans l'exemple 2. Puis incubés, 5 (colonne A), 15 (colonne B) et 30 (colonne C) minutes à 95°C en présence de 2% SDS.

30

35



Les produits de la réaction ont été analysés par électrophorèse en gels de 12 % polyacrylamide en conditions dénaturantes (7M urée). Les gels ont subi une autoradiographie. Dans cette manipulation, les liaisons hydrazones n'ont pas été réduites.

5

Les bandes supérieures (flèche s) correspondent aux ARNs biotynilés avec la liaison hydrazone unissant le linker de la biotine et de l'oligoribonucléotide. Les bandes inférieures (flèche i) correspondent aux molécules (oligoribonucléotide) oxydées. La liaison hydrazone n'ayant pas  
10 été stabilisée au cours du chauffage, elle peut se casser et l'oligoribonucléotide retourne à la forme dialdéhyde. La colonne D présente l'oligoribonucléotide marqué au pCp comme décrit dans l'exemple 1.1.

15 EXEMPLE 3 : METHODE DE PREPARATION D'ADNc COMPLETS . ETUDE DES ARNs COIFFES OU NON COIFFES SYNTHETIQUES

Cette méthode comprend les étapes de :

20 A) Marquage de l'extrémité 5' des ARNs par une étiquette

A.1) Oxydation du diol de la méthyl-7-guanosine en dialdéhyde.

A.2) Fonctionnalisation de l'extrémité 3' de l'étiquette qui doit  
25 présenter un groupement NH<sub>2</sub>.

A.3) Ligature chimique de l'étiquette fonctionnalisée sur la coiffe.

30 B) Transcription inverse des ARN étiquetés.

La transcription inverse est amorcée suivant l'une des voies classiques consistant à utiliser une amorce oligo-dT, une amorce aléatoire ou encore un amorçage spécifique comme dans les réactions d'extension d'amorces.

35

## 1) Méthode

### 1.1. Fonctionnalisation de l'oligonucléotide étiquette à ligaturer

5 L'acide nucléique phosphorylé en 3' est transformé en hydrazide en 3' par le traitement de l'acide nucléique avec une solution aqueuse d'hydrazine ou de dihydrazide de formule  $H_2N(R_1)NH_2$  à environ 1 à 3M, et à pH 4,5, en présence d'un agent du type carbodiimide soluble dans l'eau, par exemple du 1-ethyl-3 (3-diméthylaminopropyl) carbodiimide, à  
10 une concentration finale de 0.3M à une température de 8°C pendant la nuit.

L'oligonucléotide est alors séparé des autres agents et produits par une technique standard d'isolement des oligonucléotides.

15

### 1.2. Préparation de la molécule d'ARNm receveuse de l'étiquette.

#### a) élimination des fonctions 3'-OH

- par ligature enzymatique de séquences dépourvues de 3'-OH par  
20 exemple ligature de pCp comme décrit dans (14) ;

- par hydrolyse alcaline des ARNs selon le protocole suivant dans lequel on réalise l'hydrolyse alcaline dans un volume final de 100 µl en présence de 1,5 µg d'ARNm en soude 0,1N durant 40 à 60 minutes à 4°C puis la solution est neutralisée à l'acide acétique et précipitée dans l'éthanol.

25

#### b) Oxydation des fonctions diol.

. Jusqu'à 1 DO d'ARN est dissoute dans 9 µl de tampon (0.1 M acétate de sodium pH 6-7 ou d'eau) et 3 µl de solution de periodate de sodium  
30 0.1M préparée extemporanément.

. On laisse incuber 1h à l'obscurité.

. On arrête la réaction en ajoutant 4 µl d'éthylène glycol 10%.

. On laisse incuber à température ambiante 15 minutes

. On fait une précipitation éthanolique du produit et on dialyse  
35 contre de l'eau.

## 1.3. Ligature chimique.

- 5 . On dissout l'ARN dans un milieu acide 50  $\mu$ l d'acétate de sodium pH 4-6 et 50  $\mu$ l de solution d'étiquette fonctionnalisée, puis on réduit avec un borohydrure, de telle sorte qu'un rapport 1:20 ARN:étiquette soit obtenu.
- . On laisse incubé 2h00 à 37°C ou une nuit (14h) à 10°C.
- 10 . On précipite à l'éthanol et on dialyse contre de l'eau distillée pour les analyses comme des électrophorèses en gel d'acrylamide ou des HPLC.

## 1.4. Transcription inverse.

- 15 a) synthèse du premier brin ADNc
- Matériel et réactifs -
- Bains Marie (90°C et 40°C)
  - Carbo-glace
  - Albumine de sérum bovin acétylé (10mg/ml (Biolab's)
  - RNAsine (5U/  $\mu$ l, Promega Biotech). la RNAsine est fournie à la
  - 20 concentration de 40U/ $\mu$ l, on la dilue à 5U/ $\mu$ l dans un tampon RT
  - $\beta$ -mercaptoethanol (350mM Sigma). Le  $\beta$ -mercaptoethanol commercialisé est fourni à la concentration de 14,4M, pour obtenir une solution de 350mM  $\mu$ l mélanger 50  $\mu$ l avec 1950  $\mu$ l d'eau distillée.
  - 10 x tampon RT (100 mM Tris HCL, pH: 8.3 (42°C), 80mM KCL, 16mM
  - 25 MgCL2)
  - 100 mM de solutions de chaque dNTP (Pharmacia ou Boehringer)
  - 1mM dCTP
  - 20mM de pyrophosphate de sodium
  - ( $\alpha$ - 32P) dCTP 400 Ci/mmol (Amersham)
  - 30 L'oligonucléotide utilisé pour amorcer la transcriptase inversée en solution (100ng/ $\mu$ l en eau distillée) en eau distillée.
  - oligo dT (15-17 (Boehringer)
  - amorces à séquence aléatoire
  - amorce spécifique
- 35

## Méthode :

- l'ARN est dilué dans 18  $\mu$ l d'eau chauffée à 95° C, 5 min, puis on ajoute la solution décrite ci-dessus en 1.2.

5 - on mélange les composants suivants dans un tube à microcentrifugation

	10 X tampon RT-	2.5 $\mu$ l
	BSA (5 l- $\mu$ l/ $\mu$ l-)	1 $\mu$ l
	RNAsine (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10	dATP (100mM)	2 $\mu$ l
	dTTP (100mM)	0,5 $\mu$ l
	dGTP (100mM)	0,5 $\mu$ l
	dCTP (1 mM)	2,5 $\mu$ l
	pyrophosphate de sodium (200mM)	1 $\mu$ l
15	eau à 24 $\mu$ l	-

On mélange avec la solution d'ARN avec l'amorce hybridée, on incube pendant 45 minutes à 42°C et,  
On conserve à - 20° C jusqu'à l'utilisation.

## 20 2) Résultats expérimentaux

2.1. Ligature d'oligodéoxyribonucléotides à un 200 mère et un 46 mère ARN.

25 A) Des oligoribonucléotides de 46 ou 200nt sont produits in vitro. En fonction des réactifs utilisés pour leur synthèse, ces oligoribonucléotides sont coiffés ou non (respectivement 200+, 46+ et 200-, 46-). Les séquences des oligonucléotides 46+ et 46- ont été données dans l'exemple 1, paragraphe 3. Pour le 200 mère, les séquences sont les suivantes :

30

200+ :

m7GpppGCUCCUAUCCCACACUCUCUCACCAUCCTCCACUAUCACCUUUACAUC  
CAAUCCAAUCCCAAUUACAUUACUCAUCCUAAACUCUACCUCUACCCUUCAU  
35 UAACUCCAUUUCCAUUACCUUCUCCAUAUAACUCCUUAUAUAUUAUU  
UCAUCUCACCCUCUACCUCACACAUCUCCCACCUUAUCUACCCUAUACCUCUA  
CUC

200 :

pppGCUCCUAUCCCACACUCUCUCACCAUCCTCCACUAUCACCUUUACAUCCA  
AUCCAAUCCCAUUACAUAUACUCAUCCUAAACUCUACCUCUACCCUUAUUA  
5 ACUCCAUUUCCAUCACCUUCUCCAUAUACUACUCCUUAUACUAUUCAUUUC  
AUCUCACCCUCUACCUCACACAUCUCCACCUUAUCUACCCUAUACCUCUACU  
C.

Après leur synthèse, les oligonucléotides sont soumis au procédé  
10 décrit en 1.2.a (ligature au pCp), pour bloquer leur extrémité 3'-OH puis au  
procédé décrit en 1.2.b pour oxyder les oligonucléotides coiffés.

B) Un oligodéoxyribonucléotide de 17 nt (GTTAGTGTGGTTGATCT) dont  
l'extrémité 3'OH a été modifiée en 3'-P est soumis au procédé décrit en 1.1.  
15 pour lui adjoindre une fonction hydrazide en 3'.

C) Par la suite, l'oligodéoxyribonucléotide produit en 2.1.B et les  
oligoribonucléotides produits en 2.1.A. sont mis en ligature comme décrit  
au 1.3.

20 Figure 4 : dans les colonnes A et B sont représentés les résultats où  
sont déposés les oligoribonucléotides de 200nt non coiffés, ligaturés  
(colonne B) ou non (colonne A) avec un oligodésoxyribonucléotide  
hydraziné. Dans les colonnes C et D sont déposés les oligoribonucléotides de  
25 200nt coiffés, soumis (colonne D) ou non (colonne C) à la ligature avec un  
oligodésoxyribonucléotide hydraziné.

Cet exemple montre la spécificité de la réaction d'étiquetage des  
ARNs coiffés. Dans les conditions expérimentales utilisées, 30 % de  
30 l'oligoribonucléotide coiffé sont ligaturés à l'étiquette.

Figure 5 : dans les colonnes A et B sont représentés les résultats où sont déposés les oligoribonucléotides de 46nt non coiffés ligaturés (colonne B) ou non (colonne A) avec un oligodésoxyribonucléotide hydraziné. Dans les colonnes C, D et E sont représentés les résultats où sont déposés les oligoribonucléotides coiffés ligaturés avec un oligodésoxyribonucléotide hydraziné (colonnes D et E). La colonne C représente l'oligoribonucléotide coiffé non oxydé et non ligaturé. Dans les colonnes D et E les bandes à la hauteur de la flèche a représenté l'oligoribonucléotide de 46nt oxydé non ligaturé, les bandes à la hauteur des flèches b représentent le produit de ligature.

Cet exemple montre la spécificité de la réaction d'étiquetage des ARNs coiffés avec une autre espèce moléculaire d'ARN.

## 2.2. Transcription inverse des produits ligaturés.

Un oligoribonucléotide de 46nt est produit in vitro, coiffé ou non. Puis, il est soumis au procédé de ligature à une étiquette comme décrit en 1.3, afin de le ligaturer à un oligodésoxyribonucléotide hydraziné de 17 nt.

L'oligoribonucléotide ligaturé (correspondant aux bandes b des colonnes D et E, figure 5) et l'oligoribonucléotide non ligaturé (correspondant aux bandes a des colonnes D et E de la figure 5) ont été purifiés sur gel. Dans la figure 6 les colonnes A et B représentent l'oligoribonucléotide non ligaturé reverse transcrit (colonne B) ou non (colonne A). Les colonnes C et D représentent l'oligonucléotide ligaturé reverse transcrit (colonne D) ou non (colonne C).

On remarque que dans les deux cas, les produits sont radiomarqués car, le 46 mere produit est bloqué en 3' au pCp radioactif. Mais, les mêmes quantités d'oligonucléotides ont été déposées dans les colonnes A, B, C et D. Le signal plus intense dans les colonnes B et D ainsi que la présence d'une bande surnuméraire témoignent de la réalisation de la transcription inverse.

Le signal de la colonne D indique que la transcription inverse a été réalisée à travers la coiffe.

EXEMPLE 4 : METHODE DE PREPARATION D'ADNc COMPLETS (II: ETUDE SUR DES ARNm PLACENTAIRES)

La méthode comprend le mêmes étapes que dans l'exemple 3. Nous  
5 avons apporté quelques modifications dans la réalisation pratique de la méthode.

1) Méthode

10 1.1. Fonctionalisation de l'oligonucléotide étiquette à ligaturer.

3 unité DO de l'oligodéoxyribonucléotide de séquence

ATCAAGAATTCGCACGAGACCATTA (extrémités 5' -OH et 3' -P) sont  
15 dissoutes dans 70µl d'une solution 1.5M d'hydroxybenzotriazole pH 5.3  
réalisée dans du Diméthylformamide/Eau (75:25) contenant 2µg de 1-ethyl-  
3 (3-diméthylamibnpropyl) carbodiimide. Incuber 2h30 à 22°C.

Précipiter deux fois dans du LiClO<sub>4</sub>/Acétone.

20 Resuspendre le culot dans 200µl d'hydrazine 0.25M.

Incuber à 8°C de 3 à 14h00.

Précipiter deux fois dans du LiClO<sub>4</sub>/Acétone.

1.2. Préparation de la molécule receveuse de l'étiquette.

25

a) Préparation des ARNm de placenta

Les ARNs messagers ont été extraits à partir de blocs de 2cm de côté  
de placenta conservé à -80°C en utilisant les techniques classiques  
d'extraction d'ARN totaux en phénol acide puis de chromatographie oligo  
30 dT pour purifier les ARNm. L'intégrité des ARNm est vérifiée par  
Northern Blot.

b) Oxydation des fonctions diols

Comme décrit dans l'exemple 3, paragraphe 1.2.

35

1.3. La Ligature chimique a été réalisée comme décrit dans l'exemple 3 paragraphe 1.3. Avec la modification suivante : l'étape de précipitation est remplacée par une étape de chromatographie d'exclusion pour élimier les oligodésoxyribonucléotides hydrazinés non ligaturés. Le protocole suit

5 est le suivant :

a) Préparation de la colonne

On équilibre 10ml de gel AcA34 (BioSeptra#230151) dans 50 ml de tampon (Tp : 10mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % SDS).

10 On laisse sédimenter. On élimine le surnageant. Le gel est remis en suspension dans 50 ml de Tp.

On répète cette étape 2 ou 3 fois.

On introduit une bille de verre (diamètre 3mm) dans une pipette jetable de 2ml (longueur 25cm).

15 On remplit la pipette de la suspension de gel jusqu'à ce que la hauteur de gel se stabilise à 1cm du haut de la pipette.

On équilibre alors la colonne avec 20ml de tampon d'équilibration (10mM Tris Hcl pH 7.4, 20 mM NaCl).

20 b) Chromatographie

On mélange 10µl d'échantillon (ARN étiqueté) dans 39µl d'Urée 10M et 2µl de tampon bleu-glycérol (dissoudre 5mg de bleu de bromophenol dans 60 % de glycérol (v/v), filtrer avec un filtre de 0.45µm de diamètre).

25 On dépose sur la colonne. Dès que l'échantillon a pénétré, ajouter du tampon d'équilibration.

On collecte des fractions de 100µl. Une étiquette de 46nt apparaît dans la fraction 16 et les suivantes.

On conserve les fractions 3 à 15, les réunir puis les précipiter à l'éthanol.

30

1.4. Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée avec la transcription inverse Superscript II de Gibco-BRL en suivant les instructions du fabricant. Pour amorcer la réaction 50 pmoles de nonamères à séquence aléatoire sont

35 utilisés.



### 1.5. Empreintes d'ARN et d'ADNc

Les empreintes d'ADNc et d'ARN (RNA et cDNA-blots) ont été réalisées sur une membrane de nylon chargée positivement selon les méthodes classiquement utilisées. Les ADNc ont été déposés sur la  
5 membrane après que les hétéroduplexes ADNc:ARN aient subi une hydrolyse alcaline pour éliminer les ARNs.

Un oligodésoxyribonucléotide de séquence (TAATGGTCTCGTGCGAATTCTTGAT) anti-complémentaire de l'oligonucléotide  
10 ligaturé est marqué à son extrémité 5' avec du  $^{32}\text{P}$  et hybridé avec les RNA-blots. Un oligonucléotide de séquences identique à celle de l'oligonucléotide ligaturé est marqué à son extrémité 5' avec du  $^{32}\text{P}$  et hybridé avec les cDNA-blots.

### 15 1.6. Amplification en chaîne par polymérase (ACP).

Les ADNc obtenus après transcription inverse sont utilisés comme matrice de réaction d'ACP. Deux types de réactions sont réalisés.

a) Des amplifications pour détecter des séquences spécifiques  
20 (globine, deshydrogenase, pp15 et facteur d'élongation E4). Les amorces oligodésoxyribonucléotidiques suivantes ont été utilisées.

#### alpha-globine

25 GLO\_S : CCG ACA AGA CCA ACG TCA AGG CCG C  
GLO\_As : TCA CCA GCA GGC AGT GGC TTA GGA G 3'

#### deshydrogenase

30 3 DH\_S : AGT GAT TCC TGC TAC TTT GGA TGG C  
3 DH\_As : GCT TGG TCT TGT TCT GGA GTT TAG A

pp15

PP15\_S : TCC AGA ATG GGA GAC AAG CCA ATT T

PP15\_As : AGG GAG GAG GAA ACA GCG TGA GTC C

5

Facteur d'élongation E4

EFA1\_S : ATG GGA AAG GAA AAG ACT CAT ATC A

EF1A\_As : AGC AGC AAC AAT CAG GAC AGC ACA G

10

b) Des amplifications réalisées avec les oligodesoxyribonucléotides antisens (\_As) des couples décrits précédemment et une amorce choisit dans la séquence de l'oligodesoxyribonucléotide ligaturé (ATCAAGAATTCGCACGAGACCATTA).

15

## 2) Résultats expérimentaux

### 2.1. Efficacité de la ligature chimique

20

L'oligonucléotide de 25nt décrit au 1.1 Exemple 4, a été modifié comme décrit dans ce paragraphe et ligaturé à l'oligoribonucléotide de 200nt coiffé ou non décrit dans l'exemple 3.

25

Figure 7 : Colonne A : oligoribonucléotide de 200nt (radiomarké à son extrémité 3' par du <sup>32</sup>pCp) non coiffé, oxydé et ligaturé à l'étiquette. Colonne B : oligoribonucléotide de 200nt (radiomarké à son extrémité 3' par du <sup>32</sup>pCp) coiffé oxydé et ligaturé à l'étiquette hydrazinée. Dans cette colonne la bande inférieure (i) correspond au 200 mère non ligaturé tandis que la bandu supérieure (s) correspond au 200 mère ligaturé. Dans les conditions de préparation de l'étiquette et de ligature, 80 % de l'oligonucléotide coiffé ont été ligaturés.

30

## 2.2 Ligature de l'étiquette sur des ARN poly A<sup>+</sup>.

Des ARNs messagers placentaires (7µg) sont oxydés dans les conditions décrites dans l'exemple 3 puis ligaturés à un  
5 olidésoxyribonucléotide hydraziné dans les conditions décrites dans l'exemple 4. L'oligonucléotide non ligaturé est éliminé au moyen d'une chromatographie d'exclusion (AcA34) comme décrit au point 1.3 de l'exemple 4. La présence d'étiquette ligaturée est vérifiée par hybridation  
10 d'une sonde avec des dépôts d'ARNs étiquetés sur une membrane de Nylon comme décrit au point 1.5. de l'exemple 4.

La figure 8 représente une autoradiographie de la membrane après hybridation de la sonde. Tous les points sont dupliqués. Colonnes A à D : 0.5, 5, 25 et 50 fmôles d'étiquette. Colonne E : 1/10ème des ARNm étiquetés ont  
15 été déposés en deux dépôts.

## 2.3. Transcription inverse à travers la coiffe

Les 9/10ème des ARNs étiquetés obtenus au point 2.2. de l'exemple 4  
20 sont reverse transcrits comme décrits en 1.4, Exemple 4, puis déposés sur membrane et analysés comme décrit en 1.6, Exemple 4, ou utilisés comme matrice de réactions d'ACP comme décrit en 1.6 a) et b).

La figure 9 montre une autoradiographie de la membrane après  
25 hybridation avec la sonde radiomarquée décrite en 1.6.

Les colonnes A à E représentent différentes concentrations (1 pmôle, 100 fmôles, 50 fmôles, 10 fmôles et 1 fmôle) d'un oligodésoxyribonucléotide témoin de séquence identique à celle de  
30 l'étiquette ligaturée. Colonne F : Dépôt des ADNc-simple brin étiquetés. Approximativement 15 fmoles d'étiquette sont présentes.

Ces résultats démontrent que la transcription inverse peut être  
réalisée à travers la coiffe et en particulier que la transcriptase inverse  
35 franchie la liaison 5'-P-P-P-5' de la coiffe des ARN messagers eucaryotes.

La figure 10 représente la photographie d'un gel d'agarose 1,5 % coloré au bromure d'éthidium des produits d'ACP de la transcription inverse (1/20ème des produits de transcription inverse ont été utilisés pour chaque réaction d'ACP).

5

Colonnes A et B : marqueurs de poids moléculaires (décrire).  
Colonnes C et D : ACP avec les amorces globine en présence d'ADNc (Colonne C) ou non (Colonne D). Colonnes E et F : ACP avec les amorces deshydrogenase en présence d'ADNc (colonne E) ou non (colonne F).  
10 Colonnes G et H : ACP avec les amorces pp15 en présence (Colonne G) ou non (colonne H) d'ADNc. Colonnes I et J : ACP avec les amorces EIE4 en présence (colonne I) ou non (colonne J) d'ADNc.

15 Dans les colonnes C, E, G et I la présence d'une bande à la taille attendue témoigne de la présence de la séquence correspondante dans la population d'ADNc.

La figure 11 représente la photographie d'un gel d'agarose 1,5 % coloré au bromure d'éthidium. Même légende que la figure 10, mais les  
20 ACP ont été réalisées avec les oligonucléotides anti sens de chaque couple d'amorce et un oligonucléotide dont la séquence correspond à celle de l'étiquette ligaturé. Les produits d'amplification des colonnes C et E montrent que la transcription inverse a recopié la molécule d'ARN et l'étiquette oligodesoxyribonucléotidique ligaturée. Les profils obtenus  
25 dans la colonne C sont vraisemblablement dus aux conditions d'ACP qui n'ont pas été optimisées pour les couples d'amorces utilisés.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Frohman et Coll. (1988), PNAS 85, 8998-9002 ;
- 5 2. Delort et Coll. (1989), NAR 17, 6439-6448 ;
3. Dumas Milne Edwards et Coll. (1991) NAR 19, 5227-5232 ;
4. Frohman-Racine (1993), NAR 21, 1683-1684 ;
- 10 5. Maruyama et Sugano (1993) Gene 138, 171-174 ;
6. Dumas Milne Edwards (1993): Thèse de Docterat, Paris VI, 75-90 ;
- 15 7. Kato et Sekine (1993), EPO-Application : #93921061.3 ;
8. Sonenberg et Altmann (1989), EPO-Application : #89313030.2 ;
9. Reddy et Coll. (1992), Pharmac. Ther. Vol 54, pp. 249-267 ;
- 20 10. Zamecnik et Coll. (1960), PNAS 46, 811 ;
11. Agrawal et Coll. (1986), NAP 14, 6227-6245 ;
- 25 12. O'Shannessy D.J. et Coll. (1987), Anal. Biochem. 163, 204-209 ;
13. Ghosh F., EPO application N° 89 309 532.3 ;
14. Uhlenbeck O.C., Gumpert R.J. (1982), T4 RNA Ligase, The Enzymes,  
30 V. 15B (P.D. Boyer ed) pp 31-60. Academic Press ;
15. Current Protocol in Molecular Biology. N.Y. 3.15.1. (1994) Ed. John Wiley and Sons, Inc ;

## REVENDICATIONS

1. Méthode de couplage spécifique de la coiffe de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARNm eucaryote par une molécule fonctionnalisée par une  
5 fonction amine, dans laquelle on effectue les étapes suivantes :

- a) on modifie spécifiquement l'extrémité 3' dudit fragment d'ARN, notamment d'ARNm, de sorte que la dernière base ne comporte plus de groupe OH en positions 2' et 3' ;
- b) on réalise une oxydation spécifique de diol en dialdéhyde sur la  
10 fonction 2', 3'-cis diol de la méthyl guanosine de l'extrémité 5' dudit fragment d'ARNm ; et
- c) on réalise le couplage du 2', 3' dialdéhyde obtenu à l'étape b) avec la fonction amine de ladite molécule.

15 2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la modification de l'étape a) se fait par adjonction à l'extrémité 3' dudit fragment d'ARNm d'un nucléotide ou d'un oligonucléotide dont l'extrémité 3' ne comporte pas de fonction 2', 3' diol.

20 3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'à l'étape a) la modification spécifique de l'extrémité 3' dudit fragment d'ARNm est réalisée par ligature d'un nucléoside 3', 5' diphosphate (pNp) en utilisant une enzyme, notamment une ARN ligase.

25 4. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que, lorsque le fragment d'ARNm comporte une extrémité 3' polyA se terminant en 3' par une fonction 2', 3' diol à l'étape a), et la modification spécifique de l'extrémité 3' dudit fragment d'ARNm est réalisée par hydrolyse alcaline ménagée, suivie d'une étape de séparation des fragments à extrémité 3'  
30 polyA générés par l'hydrolyse alcaline.

5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que l'on réalise l'oxydation spécifique d'une fonction diol en fonction dialdéhyde de l'étape b) avec du périodate.

6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce qu'à l'étape c), on réalise le couplage de la dialdéhyde avec ladite fonction amine en milieu acide suivi d'une réduction avec un borohydrure.

5           7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que ladite molécule fonctionnalisée est une molécule biologique.

8. Méthode de marquage spécifique de la coiffe de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARNm eucaryote, caractérisée en ce qu'on utilise une  
10 méthode de couplage selon l'une des revendications 1 à 7 dans laquelle ladite molécule est une molécule de marquage.

9. Méthode d'isolement de l'extrémité 5' d'un ARNm eucaryote dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'on utilise une méthode de  
15 couplage selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite molécule est une molécule permettant l'isolement du fragment d'ARNm auquel elle est couplée.

10. Trousse de réactifs utile pour la mise en oeuvre d'une méthode  
20 selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte :  
- des réactifs de modification spécifique de l'extrémité 3' d'ARNm 2', 3' diol  
- des réactifs d'oxydation de la fonction 2'3'-diol à l'extrémité 5' en dialdéhyde ; et  
25 - des réactifs de couplage covalent entre la dialdéhyde et ladite fonction amine de ladite molécule.

11. Trousse de réactifs selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit réactif d'oxydation est du périodate de sodium.

30 12. Trousse de réactifs selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce que lesdits réactifs de couplage avec ladite fonction amine comportent un tampon acide à pH entre 4 et 6 et un réactif de réduction consistant en un borohydrure.

35

13. Trousse de réactifs selon l'une des revendications 10 à 12 caractérisée en ce que lesdits réactifs de modification de ladite extrémité sont des réactifs permettant le couplage de l'extrémité 3' dudit ARNm avec l'extrémité 5' d'un oligonucléotide ou d'un nucléotide ne comportant pas de fonction 2', 3' diol à son extrémité 3'.

14. Trousse de réactifs selon la revendication 13, caractérisée en ce que lesdits réactifs de modification de l'extrémité 3' dudit ARNm consistent en un nucléotide 3', 5' diphosphate pNp et une enzyme de ligature ARN ligase T4.

15. Méthode d'isolement de l'extrémité 5' d'un ARNm eucaryote dans un échantillon biologique selon la revendication 9, caractérisée en ce que :

1) on réalise le couplage spécifique de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm avec une première molécule P1 selon l'une des revendications 1 à 7 pour obtenir le conjugué P1-ARNm ;

2) on met ledit ARNm marqué par ladite première molécule biologique (P1-ARNm) en présence d'une deuxième molécule P2 qui se lie de façon covalente ou non covalente avec ladite première molécule de manière à former un conjugué ou respectivement un complexe (P2 / P1-ARNm) ;

3) on sépare ledit conjugué ou dit complexe P2 / P1-ARNm de l'échantillon et,

4) on effectue éventuellement la coupure de la liaison covalente ou la décomplexation entre P2 et P1 pour récupérer l'ARNm couplé P1-ARNm.

16. Méthode selon la revendication 15 caractérisée en ce que :

a) à l'étape 2) ladite deuxième molécule se trouve fixée à une phase solide et,

b) à l'étape 3) on sépare la phase solide revêtue dudit conjugué ou dit complexe de l'échantillon.



17. Méthode selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que P1 et P2 sont des molécules biologiques qui interagissent de façon non covalente et forment un complexe.

5           18. Méthode selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que P1 est l'hydrazide de biotine et P2 est l'avidine ou la streptavidine.

10           19. Méthode selon l'une des revendications 16 à 18 caractérisée en ce que la phase solide est constituée par la face interne du récipient dans lequel se trouve l'échantillon biologique ou un élément tel que des billes que l'on introduit dans ledit récipient.

15           20. Méthode selon l'une des revendications 15 à 19, caractérisée en ce qu'on isole un ARNm complet.

            21. Méthode selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisée en ce qu'elle comporte une étape supplémentaire de coupure entre P1 et ledit ARNm, pour récupérer l'ARNm non couplé.

20           22. Trousse de réactifs utile pour la mise en oeuvre d'une méthode selon l'une des revendications 15 à 21, caractérisée en ce qu'elle comporte :

- 25           - les éléments d'une trousse de couplage spécifique de la coiffe 5' d'ARNm avec ladite première molécule selon l'une des revendications 10 à 14,  
            - et une solution de ladite deuxième molécule ou une phase solide sur laquelle se trouve fixée ladite deuxième molécule.

30           23. Méthode de préparation d'extrémité 3' d'ADNc, notamment d'ADNc simple brin complet, dans laquelle on effectue les étapes suivantes :

- 35           a) on effectue une transcription inverse d'ARNm obtenu par une méthode d'isolement selon l'une des revendications 9 ou 15 à 21 ;  
            b) on élimine les ARN simples brins et fragments d'ARN non hybridés pour ne conserver qu'une population d'hétéroduplexes ADNc/ARNm dans lesquels l'ARNm est un ARNm dont la coiffe en 5' est couplée spécifiquement par une dite première molécule.

- c) on capture lesdits hétéroduplexes à l'aide d'une phase solide revêtue de ladite deuxième molécule et,
- d) on effectue une déshybridation des hétéroduplexes pour récupérer les ADNc simple brin.

5

24. Méthode selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'à l'étape b), l'élimination des ARN simples brins ou fragments d'ARN non hybridés s'effectue par traitement enzymatique à l'aide d'une enzyme qui dégrade les ARN simples brins ou non hybridés et conserve intacts les hétéroduplexes ARN/ADN.

10

25. Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'à l'étape b) on utilise une enzyme RNase T1 ou une nucléase S1.

15

26. Méthode de préparation d'ADNc double brin eucaryote correspondant à l'extrémité 5' d'ARNm et notamment d'ADNc complet dans laquelle on effectue les étapes suivantes :

20

a) On effectue le couplage de la coiffe de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARNm eucaryote, selon une méthode de l'une des revendications 1 à 6 dans laquelle ladite molécule fonctionnalisée est un oligonucléotide étiquette comportant une fonction amine à son extrémité 3' et dans laquelle méthode, la première étape de modification de l'extrémité 3' de l'ARNm est facultative,

25

b) On effectue la transcription inverse de l'ARNm ligaturé obtenu à l'étape a),

30

c) On dénature les hétéroduplexes obtenus à l'étape b) et on élimine les fragments d'ARN simples brins pour obtenir le premier brin d'ADNc,

35

d) On effectue la synthèse du deuxième brin à l'aide de l'enzyme ADN polymérase et d'une amorce dont la séquence est anti-complémentaire de la totalité ou d'une partie de la séquence dudit oligonucléotide étiquette.

27. ARNm couplé spécifiquement par la coiffe de l'extrémité 5' à une dite molécule, obtenu par une méthode selon l'une des revendications 1 à 9 ou 15 à 20.

- 5        28. Méthode de capture d'une protéine Po reconnaissant un ARNm, dans laquelle on met en présence ladite protéine avec de l'ARNm obtenu par une méthode d'isolement selon l'une des revendications 15 à 21, puis on récupère le complexe (Po/ARNm complet) et on effectue une décomplexation pour récupérer ladite protéine Po.



FIG. 1

2/7

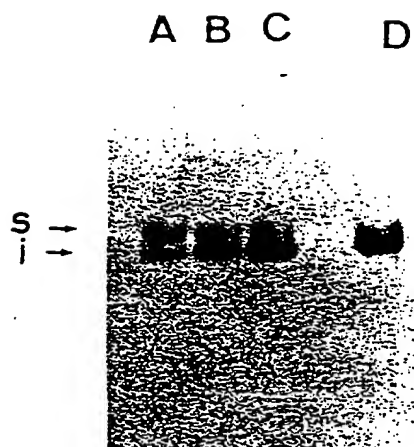
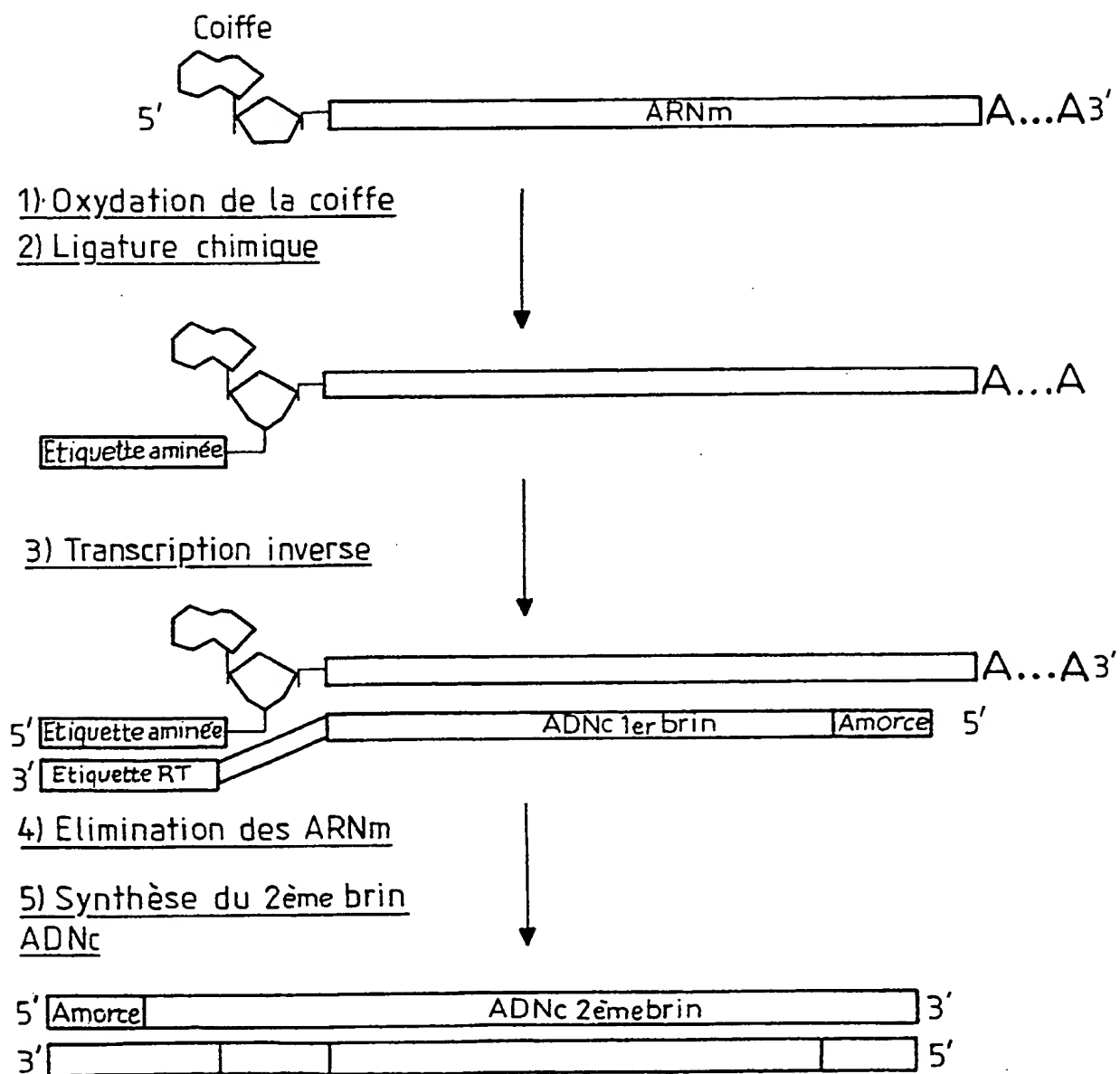


FIG. 2

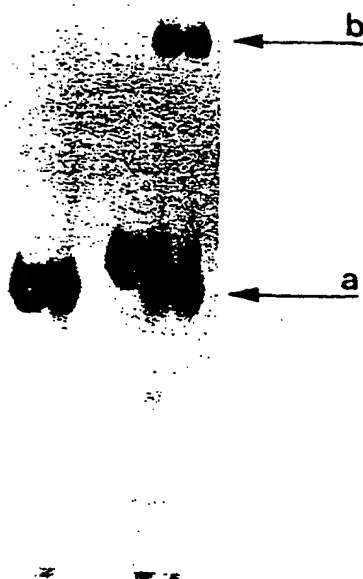
3/7

FIG\_3

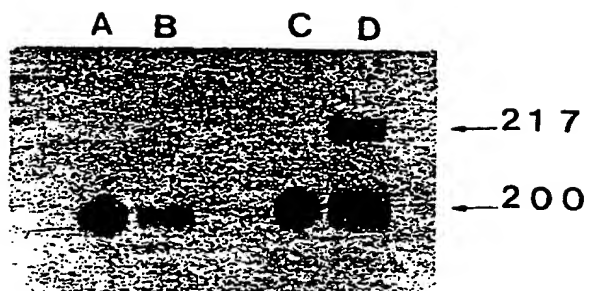
4/7

FIG\_5

A B C D E



FIG\_4

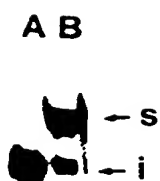


5/7

FIG\_6



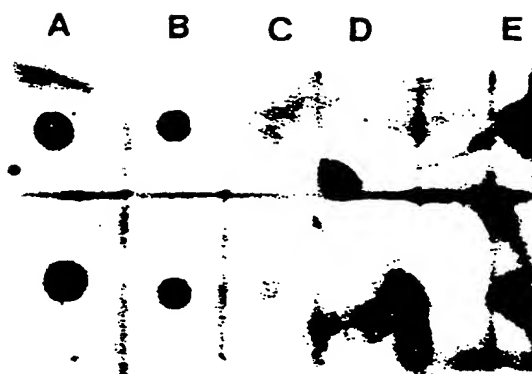
FIG\_7



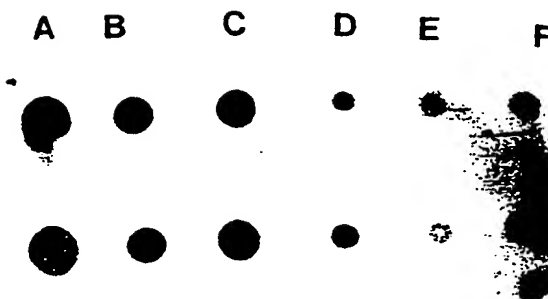


6/7

FIG\_8



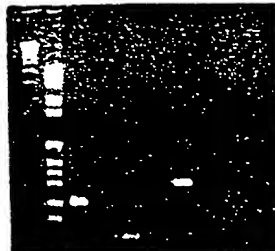
FIG\_9



7/7

FIG\_10

a b c d e f g h i j



FIG\_11

A B C D E F



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**